



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
FACOLTÀ DI AGRARIA

Dipartimento di Territorio e Sistemi Agro-Forestali

TESI DI LAUREA IN BIOTECNOLOGIE AGRARIE

Contenuto di tricoteceni in campioni di frumento e fattori coinvolti nella biosintesi delle tossine in *Fusarium graminearum*.

Relatore:

Prof. *Francesco Favaron*

Laureando:

Anna Giulia Ferrarese

Matricola n. 595713

ANNO ACCADEMICO 2010- 2011

Ai miei genitori.

Ad Alberto.

INDICE

RIASSUNTO	2
ABSTRACT	4
1 INTRODUZIONE	6
1.1 <i>I Tricoteceni: Deossivalenolo (DON)</i>	6
1.2 <i>La fusariosi della spiga del grano</i>	8
1.3 <i>Interventi per limitare la fusariosi della spiga</i>	11
1.4 <i>La regolazione della sintesi dei tricoteceni</i>	12
1.5 <i>Alcune tecniche per l'analisi quantitativa delle micotossine</i>	13
1.6 <i>Modelli previsionali per stimare il quantitativo di Deossivalenolo nel raccolto e quadro generale dell'andamento climatico nel Veneto negli anni 2009 - 2010</i>	15
2 SCOPO DELLA TESI	18
3 MATERIALI E METODI	20
3.1 <i>Frumento tenero: origine e campionamento</i>	20
3.2 <i>Quantificazione della micotossina Deossivalenolo (DON)</i>	20
3.3 <i>Coltura del fungo</i>	22
3.4 <i>Analisi della micotossina</i>	23
3.5 <i>Saggio colorimetrico dell'attività laccasica</i>	23
4 RISULTATI	26
4.1 <i>Presenza di DON in frumento tenero negli anni 2009 – 2010</i>	26
4.2 <i>Effetti del pH e della presenza di acido ferulico sulla sintesi di tricoteceni in colture liquide di Fusarium graminearum</i>	30
4.3 <i>Presenza di attività laccasica in colture liquide di Fusarium graminearum</i>	35
5 DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	36
6 BIBLIOGRAFIA	40

RIASSUNTO

Fusarium graminearum è un importante fungo fitopatogeno responsabile della fusariosi della spiga di numerosi cereali quali frumento, mais e orzo. Durante l'infezione, oltre a sintetizzare un pool di enzimi detti cell wall degrading enzymes importanti per la colonizzazione dei tessuti dell'ospite, il fungo produce alcune tossine tra le quali la più importante è il tricotecene DON.

La quantificazione del DON, conosciuto anche come vomitossina, è molto importante per gli effetti che questa tossina ha sulla salute animale e su quella umana. Dalle analisi effettuate durante questo lavoro è emerso come le condizioni ambientali ed un corretto trattamento delle colture con prodotti fitosanitari durante la fase di fioritura e spigatura possano influenzare il quantitativo di DON presente nelle cariossidi.

Durante la fase di infezione, la produzione di DON viene modulata da numerosi fattori presenti nell'ospite tra cui il pH e l'acido ferulico. Quest'ultimo è presente nella parete della cellula vegetale. Dai risultati ottenuti è stato possibile constatare come in colture *in vitro* di *F. graminearum* il pH acido e l'acido ferulico svolgano un'azione opposta per quanto riguarda la sintesi di DON, ossia un effetto inducente per il pH acido e repressivo per l'acido ferulico.

Attraverso un saggio dell'attività laccasica è emerso, inoltre, come malgrado nel genoma di *F. graminearum* siano riportati nove geni putativi di laccasi, nessuna attività laccasica sia stata riscontrata *in vitro* neppure in presenza dell'acido ferulico, fenolo capace di indurre attività laccasica in altri funghi. Tuttavia, è stato osservato che nei mezzi contenenti acido ferulico è indotta la produzione di altri metaboliti il cui ruolo deve essere ulteriormente indagato.

ABSTRACT

Fusarium graminearum, the casual agent of the *Fusaium* Head Blight, is an important fungal plant pathogen which infect many crops like wheat, maize and barley. During the infection this fungus, for colonising host tissues, produces an enzymatic pool called cell wall degrading enzymes and some toxins, among which the most important is the DON.

The quantification of DON, also know as vomitoxin, is very important for the effect that this mycotoxin have on animal and human health. The analysis performed during this work showed that the ambient conditions and the correct use of pesticides during flowering and earing of the crops can influence the DON accumulation in the kernel.

The DON production is modulated by many host factors among which the pH of host tissues and ferulic acid contained in the cell wall. In one experiment performed in liquid culture it is shown that DON synthesis by *F. graminearum* is induced at acidic pH while is repressed by ferulic acid.

Analysis of laccase activity showed that, despite the genome of *F. graminearum* contains nine sequences putatively coding for laccase, no laccase activity was detected *in vitro* even in presence of ferulic acid. Ferulic acid is a phenol capable of inducing laccase activity in other fungi. However, it was observed that in media containing ferulic acid other metabolites accumulated in the culture whose role should be further investigated.

1 INTRODUZIONE

Le micotossine sono molecole tossiche prodotte da alcune specie fungine, quali per esempio *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*. Le colture maggiormente colpite dall'attacco di questi funghi, e quindi più ricche di queste sostanze, sono quelle cerealicole (frumento, mais, orzo). Tali tossine vengono infatti sintetizzate durante la fase di infezione da parte del fungo e questo processo può avvenire in qualsiasi momento del ciclo produttivo della pianta.

La rilevazione di queste tossine risulta essere molto importante perché esse sono dannose non solo per l'uomo ma anche per gli animali: infatti tali sostanze, in seguito ad ingestione, possono provocare intossicazioni croniche o acute diverse a seconda del tipo di tossina.

1.1 I Tricoteceni: Deossinivalenolo (DON).

I tricoteceni sono un'importante classe di micotossine. Essi sono metaboliti secondari (sesquiterpeni) prodotti da diverse specie fungine tra le quali la più importante dal punto di vista tossicologico è il *Fusarium* (Grove, 1988). Sono state identificate più di 180 di queste molecole e per molte di esse è stato stabilito che il sito di attacco sono i ribosomi delle cellule eucariotiche. Tali metaboliti, infatti, legandosi alla peptidil transferasi dell'unità ribosomiale delle cellule eucariotiche, inibiscono la sintesi proteica (Ueno Y., 1977). Anche a basse concentrazioni (10^{-5} , 10^{-6} M) i tricoteceni sono potenti fitotossine in grado di procurare nella pianta ospite sintomi visibili come clorosi e necrosi (Desjardins et al., 1993).

Tutti questi metaboliti secondari presentano una struttura centrale tricyclica chiamata tricotecene e un epossido in posizione C12 e C13, fondamentale per la tossicità (Desjardins et al., 1993) (Fig.1).

Toxin	R1	R2	R3	R4	R5
DON	-OH	-H	-OH	-OH	=O
3-ADON	-OAc	-H	-OH	-OH	=O
15-ADON	-OH	-H	-OAc	-OH	=O
NIV	-OH	-OH	-OH	-OH	=O
T-2	-OH	-OAc	-OAc	-H	-OIsoval
HT-2	-OH	-OH	-OAc	-H	-OIsoval
4,15-DAS	-OH	-OAc	-OAc	-H	-H

Figura 1: Struttura di base dei tricoteceni con tabella rappresentante le diversità strutturali tra le varie micotossine (tratto da “*Trichothecenes in cereal grains*”, Foroud et al., 2009).

Sulla base della loro struttura, questi metaboliti sono stati suddivisi in diversi gruppi indicati con le lettere A, B, C e D. Fin dalla loro scoperta, gli studi su queste molecole si sono concentrati soprattutto sulla ricerca degli effetti che la loro tossicità poteva causare sia alla salute umana che a quella animale: l'esposizione ai tricoteceni è infatti molto elevata sia per l'uomo, in quanto tali sostanze sono presenti in numerosi alimenti, sia per gli animali in quanto i loro mangimi sono costituiti per la maggior parte da cereali.

All'interno del gruppo dei tricoteceni di tipo B, una delle micotossine di maggior rilevanza è il Deossinivalenolo (DON) prodotta da alcune specie di *Fusarium* e in particolare da *Fusarium graminearum* Schwabe (Rotter et al., 1996). Questo metabolita secondario è caratterizzato da un gruppo chetonico sul carbonio in posizione 8 della struttura di base di epossitricotecene (Fig.1).

Lo studio e la quantificazione di questa micotossina, conosciuta anche come vomitossina, risulta essere molto importante nel settore zootecnico: infatti, se presente a concentrazioni di 1000 *ppb* (parti per miliardo) di mangime può provocare negli animali rifiuto del cibo, ridotto aumento di peso e vomito. Anche a basse concentrazioni però può causare danni al bestiame in quanto induce immunosoppressione e quindi una maggior predisposizione degli animali all'insorgenza di altre patologie. Tuttavia il problema legato alla tossicità di questa molecola risulta essere anche di interesse per la salute umana: l'ingestione diretta di cereali contaminati o indiretta tramite prodotti di animali alimentati con mangimi contaminati dalla tossina, può portare a rischi per la salute umana causando gastroenteriti e, se la micotossina è assunta in modo prolungato, insorgenza di malattie croniche.

Per questi motivi in anni recenti la Comunità Europea si è impegnata a fornire delle linee guida attraverso le quali porre anche dei limiti massimi di contaminazione da DON sia negli alimenti, che nei mangimi. Per quanto riguarda i cereali non trasformati ad uso

umano diversi dal grano duro, la legge sancisce un limite di 1250 *ppb* di micotossina, secondo il Regolamento CE 1881/2006; mentre nel caso di granella per uso animale, contenuta in mangimi complementari e completi, il limite è imposto a 8000 *ppb*, secondo la raccomandazione 2006/576 del 17 agosto 2006 contenuta nella Gazzetta Ufficiale della Comunità Europea del 23 agosto 2006.

1.2 La fusariosi della spiga del grano.

La fusariosi della spiga del grano (in inglese *Fusarium* Head Blight, FHB) è una malattia causata dal *Fusarium graminearum* Schwabe (telomorfo: *Giberella zae* Schw. (Petch)).

Il primo caso documentato di FHB è stato in Inghilterra nel 1884, dove tale malattia veniva chiamata “la scabbia del grano” (Stack et al., 2003). In seguito sono stati registrati altri casi in varie parti del mondo: in Asia (Bai et al., 2004), in Australia (Burgess et al., 1987), in Europa (Parry et al., 1995; Xu et al., 2008), in America (Gilbert et al., 2000; McMullen et al., 2003) e in Sud Africa (Kriel et al., 2008; Scott et al., 1988). E' proprio in quest'ultima Nazione dove i problemi legati all'FHB si manifestano maggiormente e questo a causa di un sistema binario di avvicendamento (mais come coltura estiva e frumento come coltura invernale) in cui i resti delle colture permangono nel suolo rappresentando la principale fonte di inoculo dell'infezione (Kriel et al., 2008).

L'attacco da parte del *F. graminearum* avviene generalmente prima del raccolto, e in particolar modo, se le condizioni ambientali risultano favorevoli per lo sviluppo del fungo come per esempio climi piovosi ed umidi ed una temperatura tra i 10° e 30° C°, durante la fase di fioritura. Se l'andamento climatico è particolarmente umido, tra le spighe si possono infatti osservare delle masse arancioni costituiti dagli sporodochi che contengono i conidi, fondamentali per la propagazione del fungo (Blandino et al., 2010) (Fig.2).



Figura 2: Immagine rappresentate evidenti sintomi di disseccamento causati dalla fusariosi della spiga alla maturazione (1).

Disseccamento delle spighe con elementi di propagazione del fungo (2).

(*L'Informatore Agrario*, 2010)

L'infezione si manifesta in seguito all'attacco del fungo, il quale può penetrare in vari modi e soprattutto attraverso l'ovario simulando l'azione di un granulo pollinico. Una volta giunta a livello dell'ovario la spora germina e da questo momento in poi il patogeno è in grado di diffondere in modo sistemico nella spiga (Wanyoike et al., 2002). Necessari per la penetrazione e la colonizzazione dei tessuti, risultano essere un pool di enzimi detti Cell Wall Degrading Enzymes (CWDE). Tra di essi vi sono Poligalatturonasi, Pectinmetilesterasi e Xilanasi che permettono al patogeno di degradare e quindi superare la parete cellulare che rappresenta il primo ostacolo per iniziare l'infezione vera e propria. E' per questo motivo che tale gruppo di enzimi viene ormai considerato il fattore chiave nella patogenesi del *F. graminearum* (Hammer et al., 1997).

Tale infezione è responsabile di ingenti danni alle colture cerealicole situate in varie parti del mondo. In particolar modo, in seguito alla malattia si ha un notevole calo della produttività: l'infezione va infatti a colpire le cariossidi di frumento portando ad un progressivo disseccamento della spiga con danni sia quantitativi, dovuti alla diminuzione della produzione unitaria della coltura, sia qualitativi, causati dall'ottenimento di cariossidi vuote e a ridotto contenuto proteico e di glutine. Inoltre è stato riscontrato come nelle piante colpite da fusariosi della spiga vi sia un notevole accumulo di micotossine ed in particolare modo del tricotecene Deossinivalenolo (DON). Tali tossine vengono sintetizzate dal *F. graminearum* durante la fase di infezione della pianta di frumento: questi metaboliti secondari sono in grado infatti di interferire con la sintesi

proteica della pianta ospite impendole di sintetizzare efficaci sistemi di difesa e facilitando in questo modo l'infezione della pianta.

La valutazione della gravità della fusariosi della spiga viene generalmente quantificata utilizzando la scala di Parry (Parry et al., 1995), con valori compresi tra 0 e 7, a cui corrisponde un intervallo percentuale di superficie della spiga che presenta sintomi evidenti della malattia (Fig.3). Molto importante è anche il momento in cui effettuare la rilevazione dei sintomi. Essi sono infatti maggiormente visibili nella fase finale di riempimento della cariosside, e ciò risulta ancor più evidente se la coltura si presenta ancora verde e manifestando spighe dissecate. Al contrario, invece, in seguito a climi caldi e asciutti, l'identificazione dei sintomi si presenta molto più difficile e soggetta ad errori in quanto le spighe colpite dall'infezione potrebbero essere confuse con altre dissecate in seguito al progressivo processo di senescenza della pianta o a fenomeni di stress (Blandino et al., 2010).

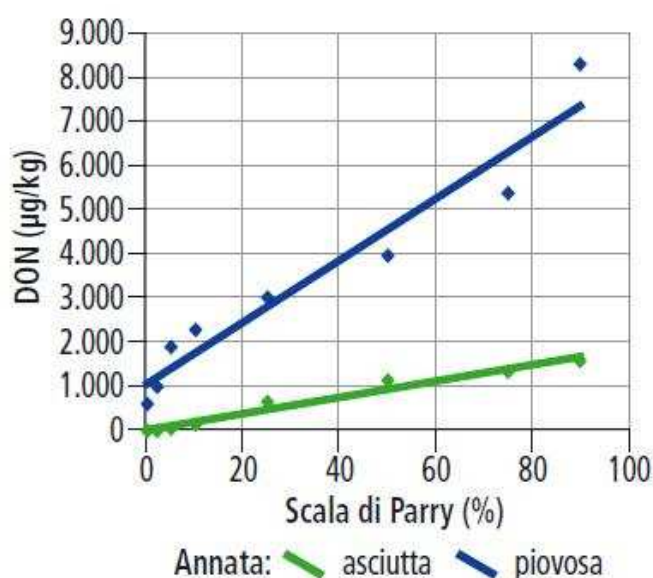


Figura 3: Relazione tra la gravità dei sintomi della fusariosi della spiga di frumento e il contenuto in Deossinivalenolo (DON) secondo la scala di Parry (tratta da "L'informatore Agrario" del 2010)

1.3 Interventi per limitare la fusariosi della spiga.

Molte ricerche recentemente effettuate, hanno dimostrato come per gestire correttamente la problematica della fusariosi della spiga, sia necessario fare una corretta analisi di tutti quei fattori che potrebbero incrementarne l'insorgenza. Il primo parametro da tenere in considerazione risulta essere innanzitutto l'utilizzo di una corretta tecnica agronomica: da alcune ricerche effettuate in Centro Europa, è risultato infatti evidente il ruolo ricoperto dall'avvicendamento. Da questi studi è emerso che i principali rischi di infezione si presentano nelle colture di frumento che succedono ad una coltura di mais da granella (Reyneri et al., 2010). Questo è presumibilmente dovuto all'elevata infezione delle paglie di queste colture da parte degli agenti della FHB (Gourdain, 2008). I residui colturali presenti sulla superficie del suolo rappresentano la principale fonte di inculo in quanto i funghi sopravvivono e svernano all'interno di questi residui colturali (Khonga e Sutton, 1988). Inoltre, altri fattori che risultano essere importanti per una riduzione dell'infezione sono: l'utilizzo di varietà poco suscettibili alla malattia ed un corretto trattamento fitosanitario. Le sostanze attive maggiormente utilizzate in Italia perchè più efficaci contro l'FHB sono: il tebuconazolo e il procloraz, entrambe applicate durante la fase di spigatura della coltura (Pancaldi et al., 2004 e 2005). Per ottenere i migliori risultati, è comunque necessario che il trattamento venga effettuato tempestivamente all'inizio dell'emissione delle antere sulla spiga che rappresenta il momento di maggior suscettibilità al patogeno (Pascale et al., 2004 e 2005). La tempestività del trattamento pre e post-infezione risulta essere fondamentale per ottenere un'effettiva efficacia contro l'FHB: i prodotti fitosanitari devono infatti essere utilizzati nei momenti della crescita della pianta in cui il rischio di infezione si presenta più alto (piena spigatura e inizio della fioritura della coltura) (Pascale et al., 2004 e 2005).

Oltre a ciò bisogna tener conto da un lato di come tutti questi fattori interagiscano tra loro contribuendo ad aumentare notevolmente la complessità del sistema, e dall'altro bisogna considerare come in aggiunta a tutti questi agenti della malattia vi sia anche il clima il quale assume una valenza nettamente superiore rispetto a quella del rischio agronomico (Campagna et al., 2005).

1.4 La regolazione della sintesi dei tricoteceni.

Durante la fase di infezione della pianta (principalmente frumento, mais ed orzo), *F. graminearum* attiva i geni *TRI* responsabili del pathway di produzione dei tricoteceni. Non è ancora ben chiara la modalità di regolazione di questi geni, ma si è a conoscenza che essi fanno parte di un cluster che include anche due regolatori trascrizionali che controllano l'espressione dei geni *TRI* (Merhej et al., 2011). In questi ultimi anni si è posta grande attenzione allo studio delle vie biosintetiche dei tricoteceni, e ciò ha permesso di conoscere a fondo tutti i geni *TRI* che costituiscono il cluster genico conosciuto come "*Fg TRI5 cluster*" (Hohn et al., 1993; Brown et al., 2004). Esso è composto da sette geni responsabili della sintesi del DON e dei suoi derivati, da due geni coinvolti nella regolazione della trascrizione (*TRI6* e *TRI10*) e da un gene che codifica per una proteina di trasporto (Desjardins et al. 1993; Kimura et al. 2007; Proctor et al. 1995; Tag et al. 2001). Il gene di maggior interesse risulta però essere il *TRI5*: esso infatti codifica per la tricotecene sintasi, enzima chiave nella via biosintetica del DON. È stato infatti dimostrato come in mutanti privati di questo gene, ci sia una drastica diminuzione della loro virulenza su piante di frumento e l'incapacità nel proseguire l'infezione (Hohn et al., 1992; Maier et al. 2006; Proctor et al. 1995). Tuttavia, è stato anche constatato come i tricoteceni non siano fondamentali per attuare l'infezione iniziale o quella della spighetta, ma siano invece fondamentali per la penetrazione del fungo nel rachide e per il successivo manifestarsi della malattia (Jansen et al., 2005).

Studi effettuati su colture *in vitro* di *Fusarium graminearum*, hanno dimostrato come la presenza di fenoli, come l'acido ferulico (Fig.4), siano in grado di modulare l'espressione dei geni *TRI* e quindi la produzione di tricoteceni in colture liquide (Merhej et al., 2009). Dallo studio di queste colture *in vitro*, è stato dimostrato come l'acido ferulico, naturalmente presente nelle pareti delle cellule vegetali delle piante cerealicole, sia un importante inibitore della produzione delle micotossine da parte di differenti specie di *Fusarium* tra cui anche il *F. graminearum* (Boutigny et al., 2009).

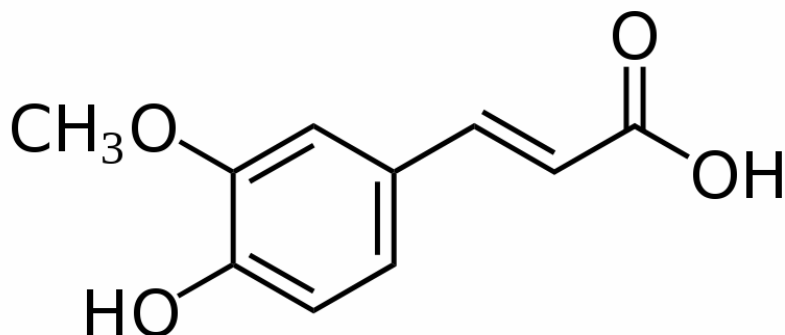


Figura 4: Struttura chimica dell'acido ferulico.

Inoltre, sempre da studi svolti su colture liquide di *F. graminearum*, è stato possibile constatare come il pH svolga un ruolo molto importante non solo per la crescita del fungo ma anche per la produzione di tricoteceni. Spostando il pH da neutro ad acido, si ha infatti un'induzione dell'espressione dei geni *TRI* e un conseguente accumulo della tossina. Anche in questo caso, come per l'acido ferulico, è stato riscontrato come cambiamenti di pH possano indurre o meno la produzione di DON in tutte le specie di *Fusarium*, e questo perchè tale meccanismo risulta essere comune a tutti i chemiotipi (Merhej et al., 2009).

1.5 Alcune tecniche per l'analisi quantitativa delle micotossine.

Attualmente esistono numerosi metodi per la quantificazione del DON. Tra i più importanti vi è per esempio la gas cromatografia (GC). Essa rappresenta una tecnica molto adatta per la determinazione dei tricoteceni ed è anche la metodologia generalmente più utilizzata per effettuare questo tipo di analisi. Ad essa viene di solito affiancata la spettrometria di massa (MS) e questo perchè tale metodo prevede l'utilizzo di gruppi idrossilici attraverso i quali è molto semplice ottenere composti con una struttura chimica simile a quella di partenza attraverso gli agenti tri-metilsililimidazolo (TMSI) (Bily et al., 2003). Altra tecnica molto utilizzata per la sua velocità e facilità d'uso è l'High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Essa consiste infatti nel determinare la presenza del DON con il detector impostato tra 214-229 nano metri (Bauer et al., 1987; Sano et al., 1987). La separazione dei tricoteceni avviene attraverso l'utilizzo

di una colonna a fase inversa (C18) e spesso è consigliato un successivo utilizzo della spettrometria di massa attraverso la quale è possibile convertire il DON in composti chimici differenti ma con la medesima struttura chimica. Questo risulta molto utile in quanto i tricoteceni assorbono poco nel range degli UV normalmente utilizzato nel metodo HPLC (A_{280}) a meno che, tali tossine non vengano derivatizzate con il p-nitrobenzolo, e quindi possano essere rilevate ad una lunghezza d'onda di 254 nano metri (Bauer et al., 1987; Sano et al., 1987).

Sono inoltre state sviluppate delle tecniche di identificazione della presenza di tricoteceni basate sull'utilizzo di test sierologici. Per effettuarli è possibile sia l'utilizzo di anticorpi monoclonali che policlonali ricavati dal sangue di alcuni mammiferi, come topo e coniglio. Il principio che sta alla base di queste tecniche è quello di utilizzare anticorpi in grado di legare l'antigene e produrre reazioni immediate ed evidenti ad occhio nudo come per esempio zone di discontinuità opache. Il test ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) rientra in questo tipo di metodiche e permette di identificare la presenza di micotossine quali il DON (Casale et al., 1988). Questa tecnica richiede l'utilizzo di anticorpi specifici in grado di legarsi all'antigene. Tali anticorpi vengono immobilizzati su un supporto in plastica e, dopo essere stati posti a contatto con il campione da analizzare, sono in grado di legarsi all'antigene di interesse qualora esso sia presente nel campione. Il riscontro visivo dell'effettivo legame tra anticorpo e antigene avviene grazie all'inserimento dello stesso tipo di anticorpo legato ad un enzima (per esempio la fosfatasi alcalina) in grado di degradare un particolare substrato emettendo così una colorazione. Questo tipo di analisi viene spesso utilizzata in quanto sensibile e veloce (Chu et al., 1986) anche se molto costosa e con lunghi tempi di attesa per il reperimento degli anticorpi specifici.

Attualmente sono presenti in commercio numerosi kit grazie ai quali è possibile effettuare in modo pratico e veloce la rilevazione del DON. Tra questi vi è per esempio il *Rapid One Step Assay (R.O.S.A.) CHARM quantitative test* (FOSS A/S, Hillerød, Danimarca): grazie ad esso è possibile effettuare una quantificazione rapida ed immediata del DON mediante l'utilizzo di strip cromatografiche e di un apposito lettore in grado di convertire l'intensità della colorazione in quantità di micotossina in *ppb* (parti per miliardo). Il principio di funzionamento di queste strip è basato sulla presenza, in corrispondenza delle linee T_1 e T_2 , di anticorpi immobilizzati e coniugati con sostanze coloranti. Una volta caricato l'estratto sulla strip, le eventuali micotossine presenti (analiti) legandosi agli anticorpi ne destabilizzano il legame con le sostanze coloranti. In

questo modo si ha la formazione di una banda in corrispondenza del punto C che verrà convertita in quantità di micotossina presente mediante l'utilizzo di un apposito lettore. Purtroppo alla praticità di questa metodologia si contrappone una minor accuratezza nella rilevazione del DON e quindi un maggior margine di errore rispetto alle tecniche più convenzionali.

1.6 Modelli previsionali per stimare il quantitativo di Deossinivalenolo nel raccolto e quadro generale dell'andamento climatico nel Veneto negli anni 2009 - 2010.

Da qualche anno si sta cercando anche in Veneto di attuare un modello di previsione dell'incidenza sia della fusariosi della spiga che del contenuto di DON nelle colture di frumento. Tale metodologia si basa su un modello statistico, già utilizzato in altri Stati quali Olanda, Canada, Stati Uniti (Prandini et al., 2008), in cui le variabili considerate sono costituite da temperatura, umidità relativa, piovosità o durata di specifiche condizioni meteorologiche che possano favorire l'incidenza della malattia (De Wolf et al., 2002). Queste importanti variabili meteorologiche vengono monitorate per 7 giorni prima dell'inizio dell'antesi e 10 giorni dopo l'inizio della fioritura. Elaborando questi dati per mezzo di un'analisi statistica basata sulla regressione lineare, si ottiene un quadro accurato e sufficientemente affidabile per stabilire con quale grado di rischio la fusariosi della spiga si possa presentare durante la fase di antesi (De Wolf et al., 2002).

Questo metodo è stato anche applicato in Olanda come tecnica per limitare il quantitativo di DON nei cereali destinati sia all'alimentazione umana che a quella animale. In questo caso le variabili prese in considerazione sono state: regione di provenienza, livello di resistenza della coltura alla FHB, trattamenti effettuati, periodo di fioritura, durata del periodo intercorso tra la fioritura e la raccolta e le diverse condizioni climatiche che si sono presentate durante le varie fasi di crescita della pianta (Van der Fels-Klerx et al., 2010). Anche in questo caso, attraverso l'utilizzo di un'analisi statistica basata sulla regressione multipla, è stato dimostrato come vi sia una correlazione tra le variabili biologiche prese in analisi e il quantitativo di DON nelle colture: in particolar modo è stato possibile constatare come una corretta analisi statistica delle condizioni che potrebbero favorire l'incidenza dell'FHB, sia un valido strumento per prevenire

l'accumulo di DON nelle colture ed evitare così i gravi rischi per la salute umana ed animale che tale micotossina può provocare (Van der Fels-Klerx et al., 2010).

Sulla base di queste metodologie, da qualche anno anche in Veneto si sta cercando di attuare un sistema di prevenzione basato sull'andamento climatico registrato durante le fasi di crescita e sviluppo delle colture. Per quanto riguarda l'annata 2008 - 2009, si sono registrate abbondanti piogge da ottobre fino ad aprile (675 mm contro una media di 440 mm), risultate invece più scarse nel mese di maggio. Dai rilievi effettuati la fusariosi della spiga, favorita da piogge durante la fioritura del frumento, non ha avuto in questa annata significativa incidenza.

Per quanto riguarda i primi mesi dell'anno 2010, invece, nella Regione Veneto si sono mantenute le condizioni di elevata piovosità già registrate durante il corso del periodo invernale. In particolar modo, le abbondanti piogge, cadute soprattutto durante il mese di aprile, hanno interessato le colture dallo stadio di levata fino alla spigatura ed in alcuni casi fino ad inizio fioritura, creando così condizioni favorevoli per un'elevata produzione di inoculo per la fusariosi della spiga. Gli abbondanti temporali, verificatesi soprattutto nell'area pedemontana, hanno provocato inoltre dei danni alle spighe facilitando così una eventuale infezione da parte del *F. graminearum*. Inoltre, bisogna considerare come, soprattutto in presenza di terreni molto pesanti, non sia sempre stato possibile procedere tempestivamente alle procedure di utilizzo dei prodotti fitosanitari durante la fase di spigatura, rimandando questa pratica preventiva alla fase di fioritura ormai ultimata, perdendo così tutti i benefici arrecati da questo tipo di trattamento.

Tuttavia, la scarsa piovosità e le elevate temperature che si sono registrate durante le settimane successive alla fioritura, hanno portato ad un calo drastico delle condizioni ideali per lo sviluppo della malattia permettendo alle cariossidi di maturare molto velocemente. (*L'informatore Agrario*, 2010).

2 SCOPO DELLA TESI

Lo scopo della mia tesi è stato da un lato, quello di indagare la presenza di tricoteceni (quali per esempio il DON) in granella di frumento tenero proveniente dal territorio vicentino e dall'altro, quello di verificare il ruolo del pH e della presenza di fenoli sull'accumulo di micotossina *in vitro*. La quantificazione di questa micotossina è stata effettuata durante il Tirocinio pratico applicativo svolto presso l'Istituto di Genetica e sperimentazione agraria "Nazareno Strampelli" di Lonigo (VI). Da qualche anno questo ente provinciale, in collaborazione con la Fondazione Studi Universitari di Vicenza, l'Università degli Studi di Padova e Veneto Agricoltura, si sta impegnando a sviluppare il progetto "*Contaminanti chimici e biologici nelle derrate di origine animale: valutazione del rischio e strategie di prevenzione*" con il quale intende elaborare protocolli che, attraverso adatti percorsi agronomici, siano in grado di favorire l'ottenimento di produzioni cerealicole identificate per qualità e sanità, in particolar modo per le tossine Aflatossine, Fumonisine e DON.

In seguito è stata analizzata l'induzione *in vitro* del DON. Sono state effettuate diverse prove su colture liquide di *F. graminearum* introducendo nel terreno di coltura sia fattori inducenti la produzione della micotossina (quali il pH acido), sia sostanze che ne potrebbero limitare la sintesi (quale l'acido ferulico). Parallelamente a questo tipo di analisi, è stata svolta una ricerca per verificare se il *F. graminearum* sia in grado di produrre attività laccasica con cui poter ossidare i composti fenolici del terreno di coltura per ridurre l'eventuale azione tossica.

3 MATERIALI E METODI

3.1 Frumento tenero: origine e campionamento.

I campioni di frumento tenero (*Triticum aestivum L.*) sono stati raccolti presso varie Aziende e Cooperative del vicentino (Agribagnolo di Lonigo, Agriberica di Poiana Magg., Coop. S. Giusta di Asigliano V. ed Essiccatoio Coop. di Barbarano V.), aderenti al progetto “*Contaminanti chimici e biologici nelle derrate di origine animale: valutazione del rischio e strategie di prevenzione*”.

In particolar modo il campionamento è stato effettuato al centro di stoccaggio secondo un protocollo concordato e i campioni prelevati sono stati identificati per area di produzione e distinti in due gruppi (Buona Pratica Agricola e pratica corrente per il frumento o stress per il mais), in base al rispetto dei protocolli di coltivazione elaborati per le colture di mais e frumento al fine di ridurre il rischio di contaminazione da micotossine. Sono stati effettuati tre prelievi in punti diversi della partita per mezzo di una sonda di profondità. Questo ha permesso di ottenere dei campioni opportunamente rappresentativi del peso di circa 3kg ciascuno. Successivamente, essi sono stati sottoposti ad essiccazione in stufa ad un'umidità inferiore al 15% e conservati ad una temperatura tra 0°- 4° C fino al momento dell'analisi.

3.2 Quantificazione della micotossina Deossinivalenolo (DON).

Prima di procedere con la quantificazione, i campioni sono stati macinati per mezzo di un molino elettrico (*Molino Golia 4V* della Novitel srl.) dotato di un contenitore antipolvere. Per evitare contaminazione tra un campione appena macinato ed il successivo, il molino e gli utensili utilizzati sono stati accuratamente puliti. Le farine così ottenute sono state conservate in sacchetti etichettati e suddivisi per Consorzio o Cooperativa, e riposti in una cella ad una temperatura compresa tra 0°- 4°C e ad un'umidità del 40%.

Per la valutazione e la quantificazione delle micotossine presenti nel frumento tenero è stato utilizzato il kit commerciale *Rapid One Step Assay (R.O.S.A.) CHARM quantitative test* (FOSS A/S, Hillerod, Danimarca), ritenuto il più rapido e affidabile per questo tipo di analisi. Esso prevede due tipi di protocollo per la quantificazione della micotossina DON nella farina di frumento: un'analisi quantitativa con estrazione 1:5 e scala da 0 a 1000 *ppb* (parti per miliardo), e un'analisi quantitativa con estrazione 1:5 e scala da 0 a 6000 *ppb*. La modalità utilizzata è stata quella con scala da 0 a 6000 *ppb* (detta anche *low ppb*) ritenuta più precisa in quanto il range di analisi risulta essere più esteso. Per entrambi questi protocolli è previsto l'uso di uno specifico tampone (*DONQ dilution buffer*) e di particolari strip in grado di determinare, tramite una variazione colorimetrica, la quantità di micotossina presente. Queste particolari strip, chiamate anche *Lateral Flow Test*, sono costituite da una membrana cromatografica inserita tra due supporti in plastica, da un pozzetto per il caricamento dell'estratto da analizzare, da una finestra per la lettura del risultato contrassegnata dalle lettere T₁, T₂ (Test), C (Control) e da una zona assorbente, opposta al pozzetto di carico, che favorisce per capillarità il flusso del campione lungo la membrana.

Ogni campione, prima di essere analizzato, è stato sottoposto ad agitazione per circa 30 secondi in modo da risultare il più omogeneo e rappresentativo possibile. In seguito, 20g di farina di frumento sono stati posti in un contenitore di plastica da 180ml e portati ad un volume di 120ml attraverso l'aggiunta di 100ml di acqua distillata (rapporto 1:5). I contenitori sono stati sottoposti ad una prima fase di agitazione di circa 1 minuto e ad una successiva fase di decantazione sempre di circa 1 minuto. Per eliminare eventuali residui di farina, 1ml di surnatante è stato posto in una provetta eppendorf da 1,5 ml e centrifugato a 6200 giri per 1 minuto. Dai campioni centrifugati sono stati estratti 300µl aggiunti in una nuova eppendorf da 1,5 ml contenente 1ml di *DONQ Buffer*. 100µl di campione diluito sono stati dispensati in una strip appena posizionata sull'incubatore caldo e lasciata incubare per 10 minuti. Al termine dell'incubazione è stata rimossa la strip dall'incubatore e verificata la formazione della banda C di controllo che deve apparire in modo chiaro e uniforme. Dopo 3minuti dal termine dell'incubazione, è stata effettuata la lettura dei campioni attraverso l'utilizzo di un apposito lettore (*R.O.S.A. – M Reader*) in grado di determinare l'intensità relativa della riflettanza delle linee T₁, T₂ e C, indicando così la concentrazione della micotossina in base alle curve di taratura presenti.

3.3 Coltura del fungo.

Il ceppo *Wild Type Vir* di *Fusarium graminearum* è stato allevato in piastre Petri su terreno contenente Potato Dextrose Agar (PDA, Difco Laboratories). Il fungo è stato fatto crescere per 3 giorni ad una temperatura di 25° C.

Le colture liquide sono state ottenute in due beute da 250ml contenenti ciascuna 50ml del mezzo Mycotoxin Synthetic medium (MS) (KH_2PO_4 0,5 g/l, K_2HPO_4 0,6 g/l, MgSO_4 0,017 g/l, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 g/l, glucosio 20 g/l, biotina 0,1 mg/l, MNS 0,1 ml/l) tamponato e non tamponato con acido citrico 40mM (0,42g/50ml) e Na_2HPO_4 20mM (0,177g/50ml) (Merhej et al., 2009), e poste in autoclave per 15 minuti a 121° C. L'acido ferulico 1mM (Boutigny et al., 2009) è stato aggiunto solo in seguito all'autoclavatura per mezzo di una siringa sterile da 1ml e filtro sterile (Syringe Filtres PVDF 13mm 0,22 μm) per evitare che le alte temperature e pressioni facessero interagire il fenolo con altre molecole organiche quali il glucosio. Ne è stata quindi preparata una quantità madre 100mM ponendo 19,4mg di acido ferulico in 400 μl di etanolo 100% e portando successivamente a volume con 400 μl di acqua. Da essa sono stati prelevati 250 μl /25ml in modo da ottenere la concentrazione 1mM.

L'acidificazione del pH e l'aggiunta di acido ferulico sono state effettuate per attuare un esperimento di tipo fattoriale, in cui ogni sostanza può essere presente o assente. E' stata quindi preparata una piastra monouso da 24 pozzetti (*Tissue Culture Plate*), di cui 12 contenenti un tondello di agar (\varnothing 5 mm) contenente micelio di *F. graminearum* in attiva crescita e 2ml di ciascuna delle quattro tesi replicate tre volte.

Le varie tesi sono state allestite come segue:

Tesi	Acido citrico (40mM) e Na_2HPO_4 (20mM)	Acido ferulico (1mM)
1	-	-
2	-	+
3	+	-
4	+	+

La coltura liquida è stata fatta crescere al buio per 10 giorni a 25° C.

3.4 Analisi della micotossina.

Dopo circa 10 giorni di incubazione al buio a 25° C, è stata effettuata un'analisi mediante l'utilizzo di un HPLC (High Performance Liquid Chromatography) per monitorare la produzione *in vitro* di Deossinivalenolo. I campioni sono stati preparati come descritto da Bily et al. (2003) prelevando 1ml di terreno di coltura da ogni pozzetto e ponendolo in una eppendorf da 2ml assieme a 1ml di etil-acetato. Dopo aver atteso la separazione di fase, è stato prelevato 1ml di surnatante e posto in una nuova eppendorf da 2ml. Il lavaggio con 1ml di etil-acetato e il successivo prelievo di 1ml di surnatante è stato ripetuto una seconda volta. Dal campione così ottenuto sono stati prelevati 1,5ml in seguito posti in un becker in modo da far evaporare l'etil-acetato. Una volta portati a secco i campioni sono stati ridisciolti in 600µl di metanolo 50% (10ml di metanolo 100% e 10ml di acqua) e posti in una nuova eppendorf da 1,5ml. Prima di essere analizzati con l'HPLC, i campioni così ottenuti sono stati filtrati per mezzo di una siringa sterile da 1ml e filtro sterile (Syringe Filtres PVDF 13mm 0,22 µm).

25µl di ogni campione così ottenuto sono stati caricati in High Performance Liquid Chromatography (HPLC Äktapurifer™, GE Healthcare, United Kingdom) per mezzo di una siringa sterile da 1ml. E' stata utilizzata una colonna (Hp ODS Hypersil 4,6x100mm) a fase inversa (C₁₈) e un loop da 25µl. L'eluizione è stata ottenuta utilizzando una miscela di tamponi: tampone A contenente TFA 0,1% (acido trifluoroacetico) e un tampone B contenente acetonitrile:H₂O 95:5. Il flusso è stato impostato a 0,5ml/minuto e il tampone B è stato mantenuto costante al 15%. L'eluito è stato monitorato a 280nm.

3.5 Saggio colorimetrico dell'attività laccasica.

Per verificare se il *F. graminearum* fosse in grado di produrre attività laccasica con cui poter ossidare i composti fenolici del terreno di coltura riducendone l'eventuale azione tossica, è stato effettuato un saggio dell'attività laccasica. La determinazione è stata realizzata mediante l'utilizzo di uno spettrofotometro come descritto da Wolfenden e Willson (1982) in un volume totale di 825µl contenenti 700µl di tampone Na acetato 50mM a pH 4 (2,5ml di acido acetico 1M diluito in 47,5ml di H₂O e portato a pH con soda), 100µl di substrato 2-2'-azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate) (ABTS)

2mM e 25µl di campione prelevato dalla coltura liquida contenente le quattro tesi (vedi paragrafo 3.3). Il saggio enzimatico è stato effettuato a 30° C monitorando i campioni ad intervalli di tempo di 10 minuti circa, ad un'assorbanza di lunghezza d'onda di 420nm (A_{420}).

Sono state inoltre preparate cinque beute da 250ml contenenti 50ml di terreno Slomczynski (glucosio 20g, glicerolo 2,8ml, L-istidina 0,25g, CuSO_4 0,078g, NaNO_3 0,9g, NaCl 0,9g, KCl 0,25g, $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,25g, FeSO_4 0,02g, KH_2PO_4 0,5g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,25g) e cinque beute da 250ml contenenti 50ml di terreno Szècsi ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 0,45g, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 1g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05g, KCl 0,25g, H_2O 500ml, pectina 1% = 5g/500ml) inducenti entrambi l'attività laccasica. Dopo aver sottoposto ad autoclavatura le beute, esse sono state inoculate con 5 tondelli di agar (\varnothing 5 mm) contenenti micelio di *F. graminearum* in attiva crescita ed incubate al buio per 3 giorni a 25° C in agitazione a 100rpm. Il saggio enzimatico per saggiare l'attività laccasica è stato effettuato incubando 25µl di campione con 100µl di substrato ABTS in 700µl di Na acetato 50mM a pH 4 a 30° C direttamente in cuvette monouso. L'assorbanza è stata misurata a 420nm (A_{420}) ad intervalli di tempo di circa 10 minuti.

4 RISULTATI

4.1 Presenza di DON in frumento tenero negli anni 2009 – 2010.

Il campionamento ha interessato tutta la pianura del basso vicentino con 122 campioni di frumento provenienti da diverse località (Agribagnolo di Lonigo, Agriberica di Poiana Maggiore, Asigliano Veneto e Barbarano Vicentino) aderenti al progetto “*Contaminanti chimici e biologici nelle derrate di origine animale: valutazione del rischio e strategie di prevenzione*”, promosso dalla Fondazione Cariverona e svolto dall’Istituto di Genetica e sperimentazione agraria “N. Strampelli” in collaborazione con la Fondazione Studi Universitari di Vicenza, l’Università degli Studi di Padova e Veneto Agricoltura. Le analisi sono state effettuate con l’utilizzo del kit *R.O.S.A. CHARM quantitative test* con il quale è stato possibile rilevare e quantificare il tricotecene Deossinivalenolo. I valori così ottenuti sono stati in seguito elaborati e divulgati durante il Convegno: “*Contaminanti chimici e biologici nelle derrate di origine animale: valutazione del rischio e strategie di prevenzione in allevamento.*”

Confrontando i dati ottenuti nell’anno 2009 e quelli registrati nel 2010, è stato possibile constatare come nel 2010 si sia presentato un aumento del numero di campioni contenenti una quantità di micotossina compresa tra 250 e 1250 *ppb* (Tab.1). Si è registrato anche un incremento considerevole per quanto riguarda i campioni inclusi nella classe 1250 – 6000 *ppb* di DON: nel 2009, infatti, solo lo 0,94 % dei campioni ha presentato una quantità di DON corrispondente a questo intervallo, contro il 20,49 % dei campioni registrati nel 2010 (Fig.5).

Nelle prove sperimentali che prevedevano l’impiego di prodotti fitosanitari, è stato rilevato come il loro utilizzo durante la fase di spigatura e fioritura, abbia diminuito il quantitativo di DON nelle cariossidi (Tab.2). Dai dati raccolti è emerso che, pur essendo presente in entrambe le tipologie di campione, la quantità di micotossina è risultata essere più elevata nei campioni non trattati rispetto a quelli su cui era stato effettuato il trattamento. Nonostante ciò, nell’anno 2010 sono stati comunque registrati valori più alti di DON rispetto all’anno precedente (Fig.6 e Fig.7).

E’ stato inoltre possibile constatare come nei campioni con maggiore contenuto di DON nelle cariossidi, è stata osservata una riduzione della qualità del prodotto come si osserva dai valori percentuali di proteine e del peso ettolitrico (Tab.3). Entrambi questi

indici sono rappresentativi del danno produttivo inferto alla cariosside da parte della malattia. Dalle analisi effettuate è stata registrata, infatti, una diminuzione rilevante sia del contenuto di proteine che del peso ettolitrico dei campioni analizzati. Anche in questo caso si sono osservate differenze tra i campioni su cui era stato effettuato un trattamento con sostanze ad azione fungicida al momento della spigatura e quelli dove invece ciò non era stato fatto. Inoltre risulta essere molto rilevante la differenza tra i campioni analizzati nell'anno 2009 e quelli effettuati nell'anno 2010 (Tab.1): le differenze tra i campioni trattati e non trattati sono più rilevanti nell'anno 2010 con un maggior calo sia del peso ettolitrico e del contenuto di proteine.

Intervallo <i>ppb</i> ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	N° Campioni	
	2009	2010
< 250	101	34
250 – 1250	4	63
1250 – 6000	1	25
> 6000	0	0

Tabella 1: Distribuzione del numero dei campioni di frumento tenero analizzati durante gli anni 2009 e 2010. La Distribuzione dei campioni nelle diverse classi di DON differisce significativamente in base al Test Chi Quadro di Pearson.

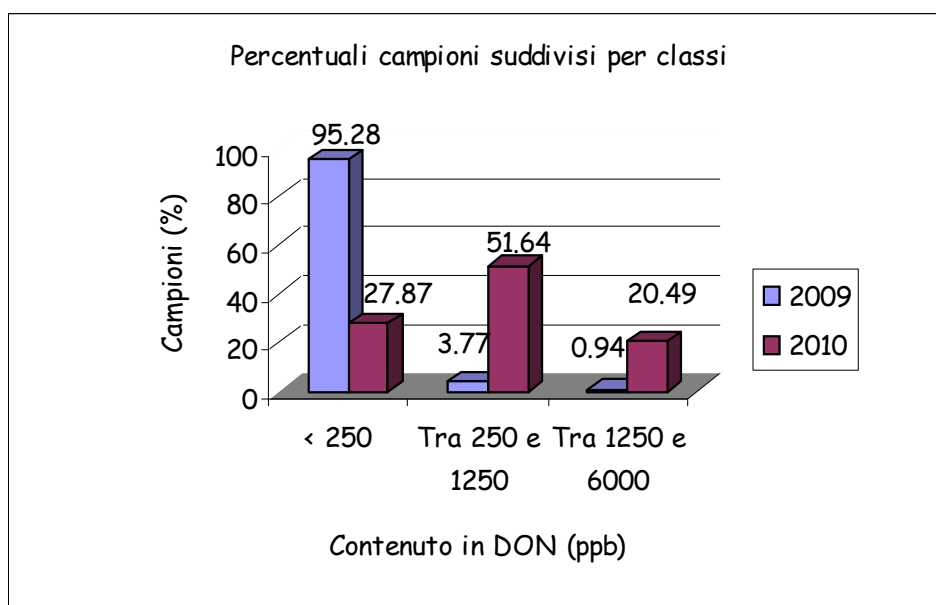


Figura 5: Percentuale di campioni di frumento, raccolti nel 2009 e 2010, suddivisi in tre classi di contenuto di Deossinivalenolo.

Intervallo ppb ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	N° Campioni dell'anno 2009		N° Campioni dell'anno 2010	
	Trattato	Non Trattato	Trattato	Non Trattato
< 250	64	37	15	19
250 – 1250	0	4	30	33
1250 – 6000	0	1	5	20

Tabella 2: Numero di campioni di frumento tenero trattati e non trattati analizzati negli anni 2009 e 2010. Nel 2009 la distribuzione dei campioni nelle diverse classi di DON differisce significativamente in base al Test Chi Quadro di Pearson, mentre per i campioni del 2010 non è stata registrata una differenza significativa.

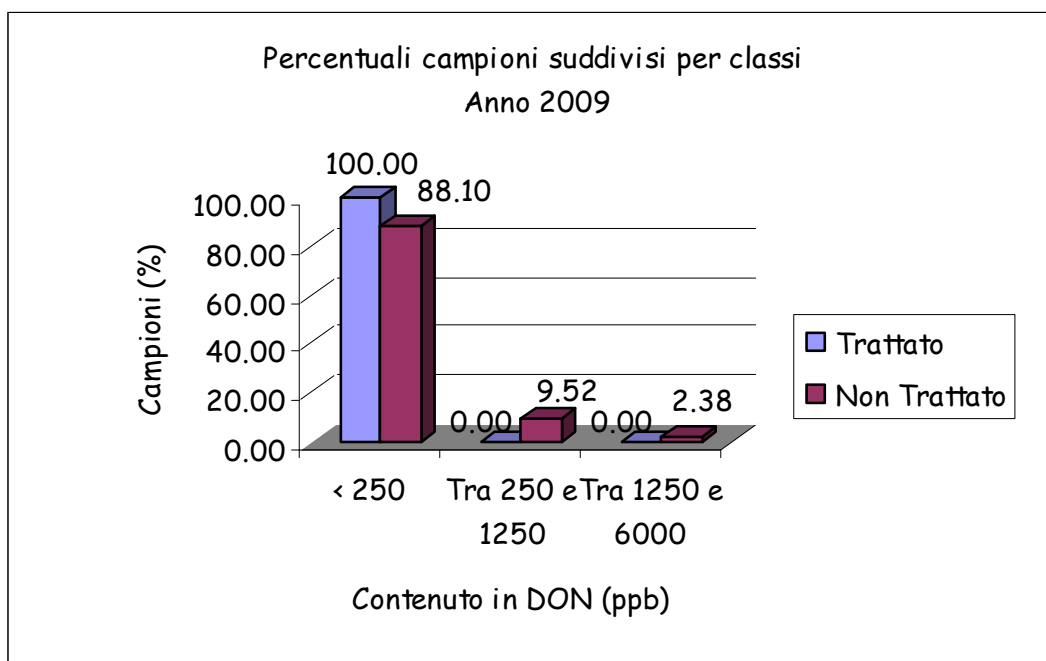


Figura 6: Percentuale del contenuto di Deossinivalenolo nell' anno 2009 in campioni di frumento trattati e non trattati con sostanze ad azione fungicida.

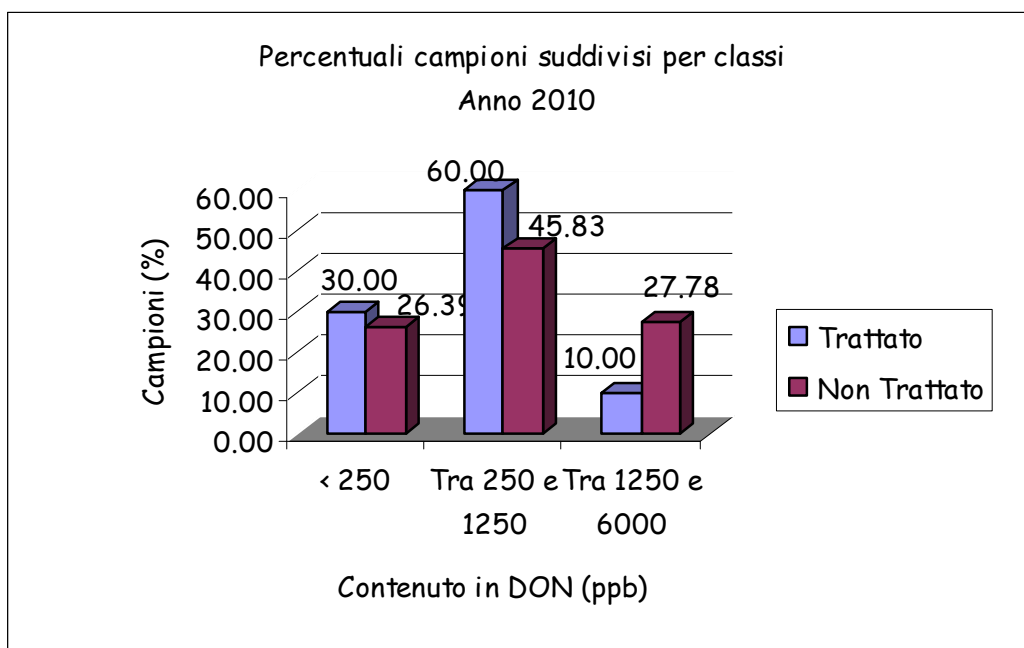


Figura 7: Percentuale del contenuto di Deossinivalenolo nell' anno 2010 in campioni di frumento trattati e non trattati con sostanze ad azione fungicida.

Tesi	2009		2010	
	Peso ettolitrico (kg/hl)	% Proteine	Peso ettolitrico (kg/hl)	% Proteine
Trattato	78,96	11,75	76,56	12,08
Non Trattato	78,59	11,25	74,35	11,07

Tabella 3: Dati relativi al calo del peso ettolitrico e del contenuto percentuale di proteine nelle cariossidi di campioni di frumento tenero trattati e non trattati con prodotti fitosanitari, rilevati negli anni 2009 - 2010.

4.2 Effetti del pH e della presenza di acido ferulico sulla sintesi di tricoteceni in colture liquide di *Fusarium graminearum*.

Fusarium graminearum è stato allevato *in vitro* sul mezzo minerale Mycotoxin Synthetic medium (MS), terreno di coltura apposito per la produzione di tricoteceni di tipo B (Boutigny et al., 2009), addizionato con acido citrico, Na_2HPO_4 e acido ferulico in combinazione fattoriale tra loro. La sintesi di tricoteceni è stata monitorata dopo 10 giorni mediante HPLC come descritto da Bily et al. (2003). Per verificare il picco di DON, è stato utilizzato uno standard (standard n°4 RIDASCREEN® DON, R-Biopharm Group, Darmstadt, Germany) contenente 33,3 *ppb* di DON. In questo modo è stato possibile ottenere un cromatogramma (Fig.8) che indica sia il tempo di ritenzione del DON sia della sua forma acetilata 15-ADON.

Dalle corse dei campioni dell'esperimento, è emersa la presenza di più picchi da attribuire sia alla presenza di DON e della sua forma acetilata, sia alla composizione del terreno e ad eventuali metaboliti secondari prodotti dal fungo durante la sua fase di crescita. Nonostante questo tutti i campioni hanno presentato due picchi: il primo circa in corrispondenza di 1,7 ml e il secondo circa in corrispondenza di 2 – 2,30 ml. L'altezza di questi picchi è risultata notevolmente elevata nei campioni contenenti il terreno MS (tamponato e non tamponato con acido citrico e Na_2HPO_4) addizionato con acido ferulico (Fig.11 e Fig.12). Solo nei campioni ottenuti dalle colture tamponate (pH acido) e non tamponate (pH neutro) l'altezza dei picchi si è dimostrata concorde con i valori attesi: il campione contenente il terreno MS acidificato attraverso l'aggiunta di acido citrico e Na_2HPO_4 ha infatti presentato un primo picco nettamente più elevato rispetto a quello rilevato nel campione contenente il solo terreno MS (Fig.10 e fig.9). Questo conferma dunque l'ipotesi, già dimostrata da Merhej et al. (2009), secondo cui il pH risulta essere un importante induttore dell'espressione dei geni *TRI* e di conseguenza uno stimolatore della produzione della micotossina.

Il campione contenente il terreno MS addizionato con acido ferulico, ha presentato un primo picco a 2,03 ml di notevole altezza (51,76 mAU) (Fig.11). Nel campione ottenuto dalle colture MS acidificato e con acido ferulico, sono stati rilevati due picchi di notevole altezza, di cui solo il primo è coincidente con quello dello standard di acido ferulico (Fig.12).

I campioni sono stati sottoposti anche ad un'analisi quantitativa per mezzo del kit *R.O.S.A. CHARM quantitative test*, gentilmente messo a disposizione dall'Istituto di

Genetica e sperimentazione agraria “N. Strampelli”. La metodologia seguita è stata la medesima utilizzata per la quantificazione del tricotecene DON nei campioni di frumento tenero precedentemente descritta nei materiali e metodi (paragrafo 3.2). La lettura delle strip è stata effettuata utilizzando la MATRIX01 che presenta un range di rilevazione da 0 a 6000 *ppb*. Da questa prima lettura è risultato che il campione contenente il terreno MS acidificato presentava un maggior quantitativo di DON sia rispetto al campione contenente il solo terreno MS, sia rispetto ai due campioni (MS tamponato e non tamponato con acido citrico e Na₂HPO₄) contenenti acido ferulico (Tab.4). Dalla misurazione è inoltre emerso come, seppure mantenendosi ad un livello basso, il campione contenente il terreno MS acidificato e addizionato con acido ferulico, ha presentato un quantitativo di micotossina superiore rispetto al campione contenente solo acido ferulico (Tab.4).

TESI	MATRIX01 (da 0 a 6000 <i>ppb</i>)
Terreno MS	91,8*
Terreno MS acidificato	144*
Terreno MS + acido ferulico	21*
Terreno MS acidificato + acido ferulico	51,6*

Tabella 4: Quantitativo di Deossinivalenolo espresso in *ppb* presente nei vari campioni presi in analisi e rilevato con matrice di lettura MATRIX01 (da 0 a 6000 *ppb*) presente nel kit commerciale R.O.S.A. *CHARM quantitative test*.

* = valori inferiori al LOD (Limited Of Detection) dell'apparecchiatura. Tale limite presenta come soglia minima per la rilevazione 250*ppb* di micotossina. I valori al di sotto di tale soglia vengono comunque rilevati, ma il valore potrebbe essere meno accurato e preciso.

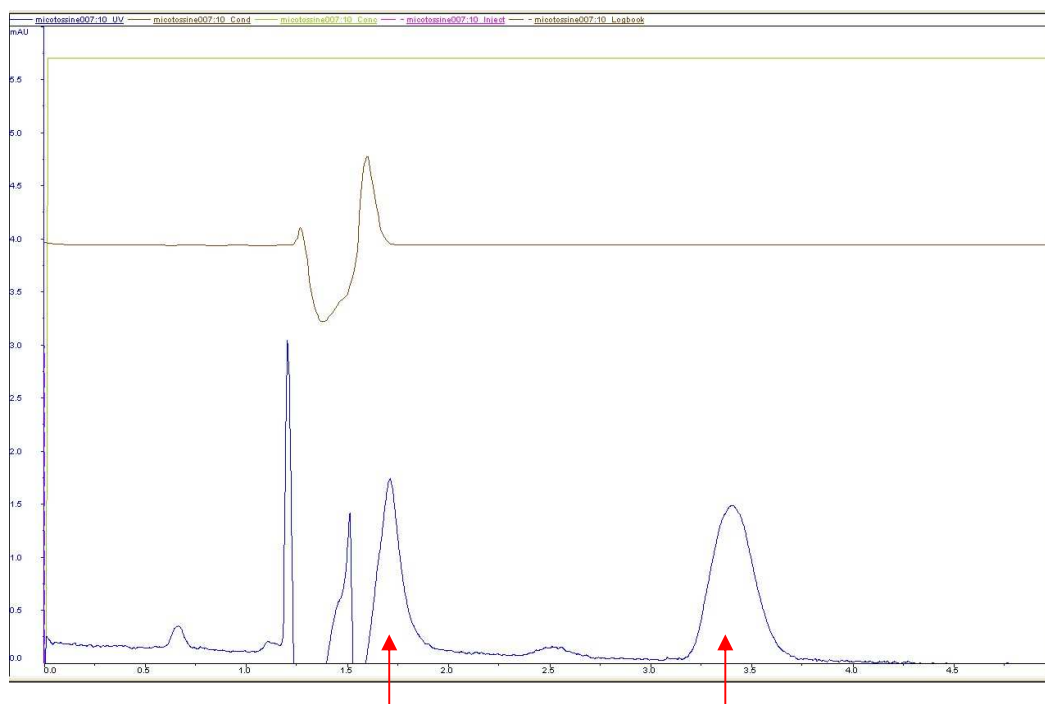


Figura 8: Profilo HPLC monitorato con UV a 280nm del campione standard n°4 (RIDASCREEN® DON, R-Biopharm) contenente 33,3ppb del tricotecene Deossinivalenolo. E' stato utilizzato un gradiente binario con isocratica al 15% della colonna B contenente TFA 0,1% in acetonitrile:H₂O 95:5. Un primo picco è stato rilevato a 1,7ml con un'altezza di 1,73mAU ed un secondo picco è stato rilevato a 3,4ml con un'altezza di 1,49mAU.

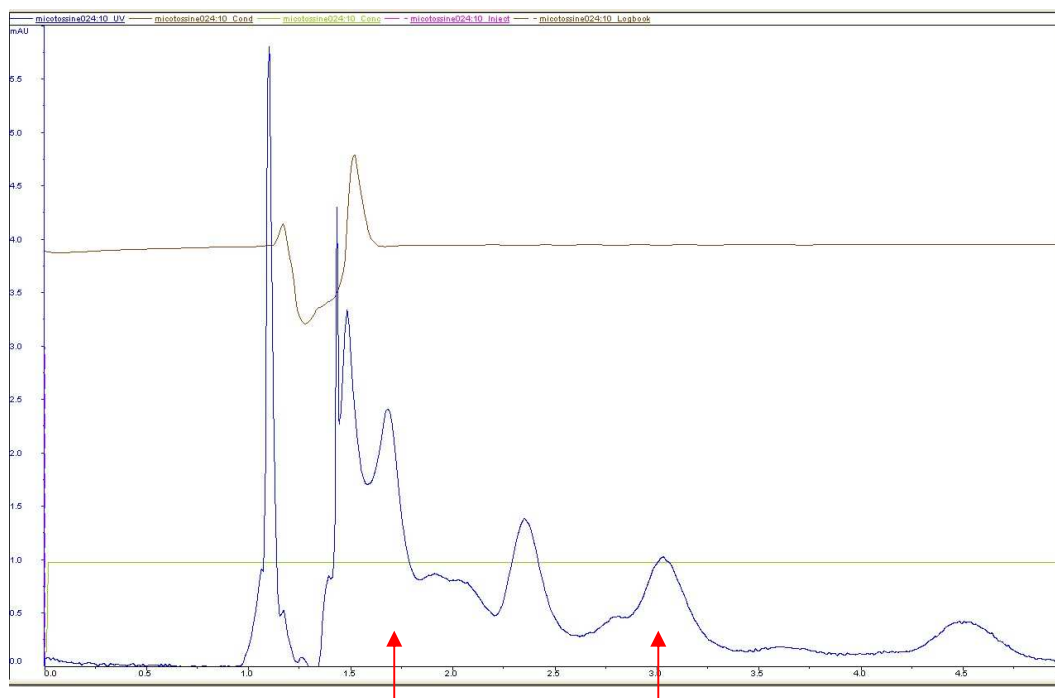


Figura 9: Profilo HPLC monitorato con UV a 280nm del campione contenente solo terreno MS. E' stato utilizzato un gradiente binario con isocratica al 15% della colonna B contenente TFA 0,1% in acetonitrile:H₂O 95:5. Il primo picco è stato rilevato a 1,68ml con un'altezza di 2,42 mAU ed il secondo picco è stato rilevato a 2,32 ml con un'altezza di 1,39 mAU.

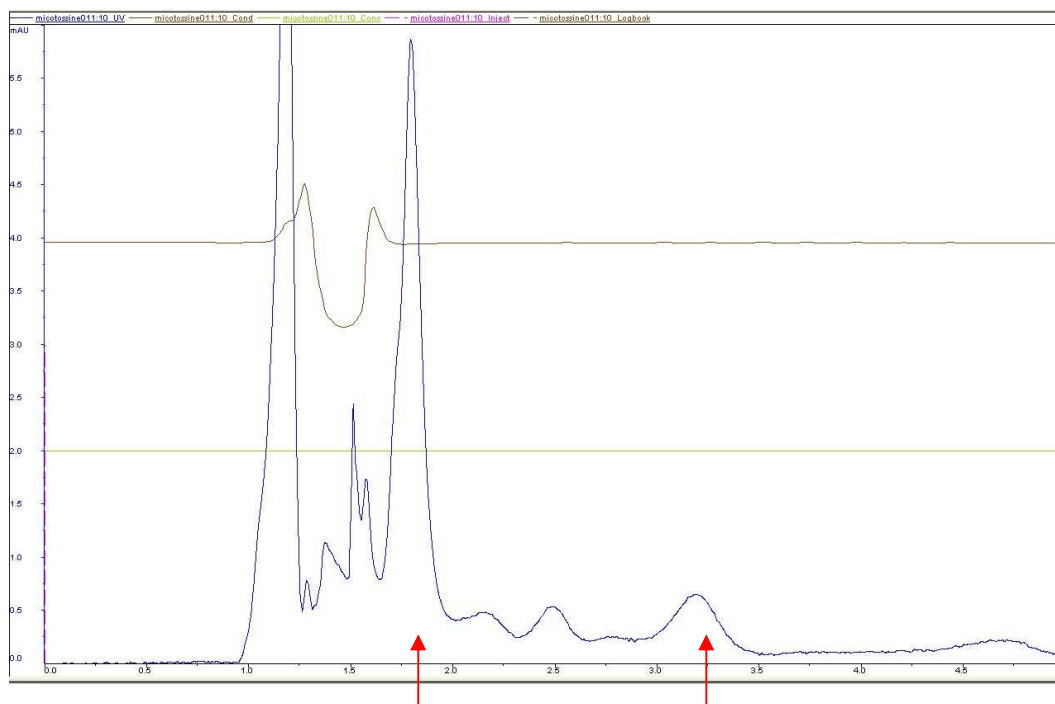


Figura 10: Profilo HPLC monitorato con UV a 280nm del campione contenente il terreno MS acidificato con l'aggiunta di acido citrico e Na_2HPO_4 . E' stato utilizzato un gradiente binario con isocratica al 15% della colonna B contenente TFA 0,1% in acetonitrile: H_2O 95:5. Il primo picco è stato rilevato a 1,73ml con un'altezza di 5,86 mAU ed il secondo picco è stato rilevato a 2,49 ml con un'altezza di 0,54 mAU.

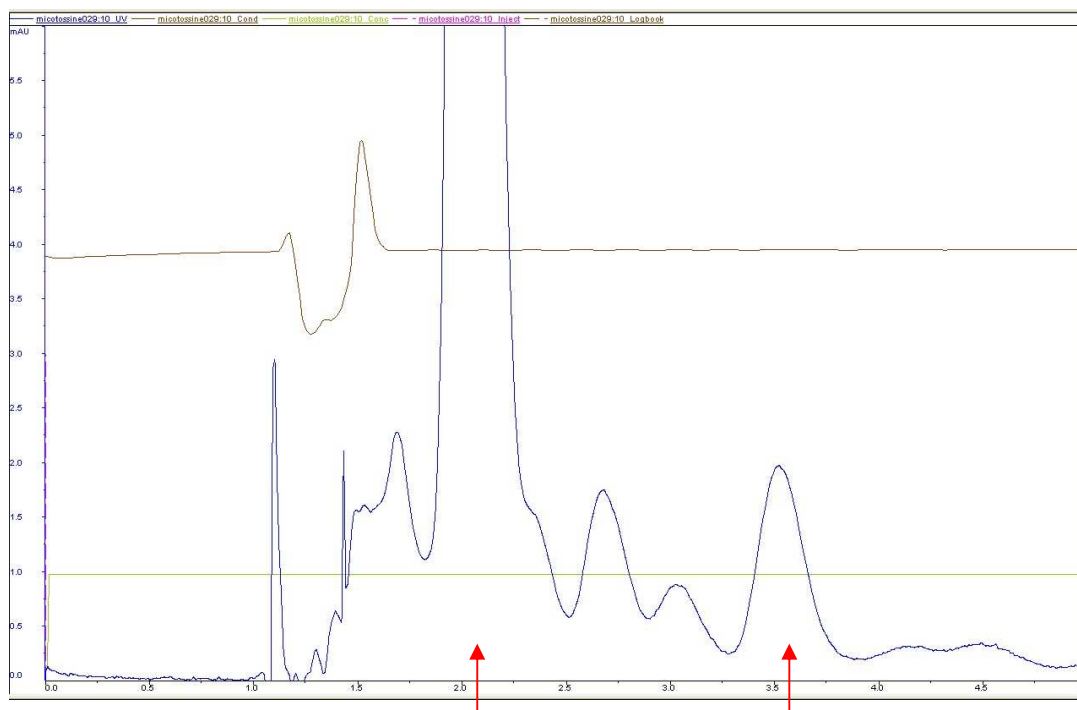


Figura 11: Profilo HPLC monitorato con UV a 280nm del campione contenente il terreno MS con l'aggiunta di acido ferulico. E' stato utilizzato un gradiente binario con isocratica al 15% della colonna B contenente TFA 0,1% in acetonitrile: H_2O 95:5. Il primo picco è stato rilevato a 2,03ml con un'altezza di 51,76mAU ed il secondo picco è stato rilevato a 3,52ml con un'altezza di 1,98mAU.

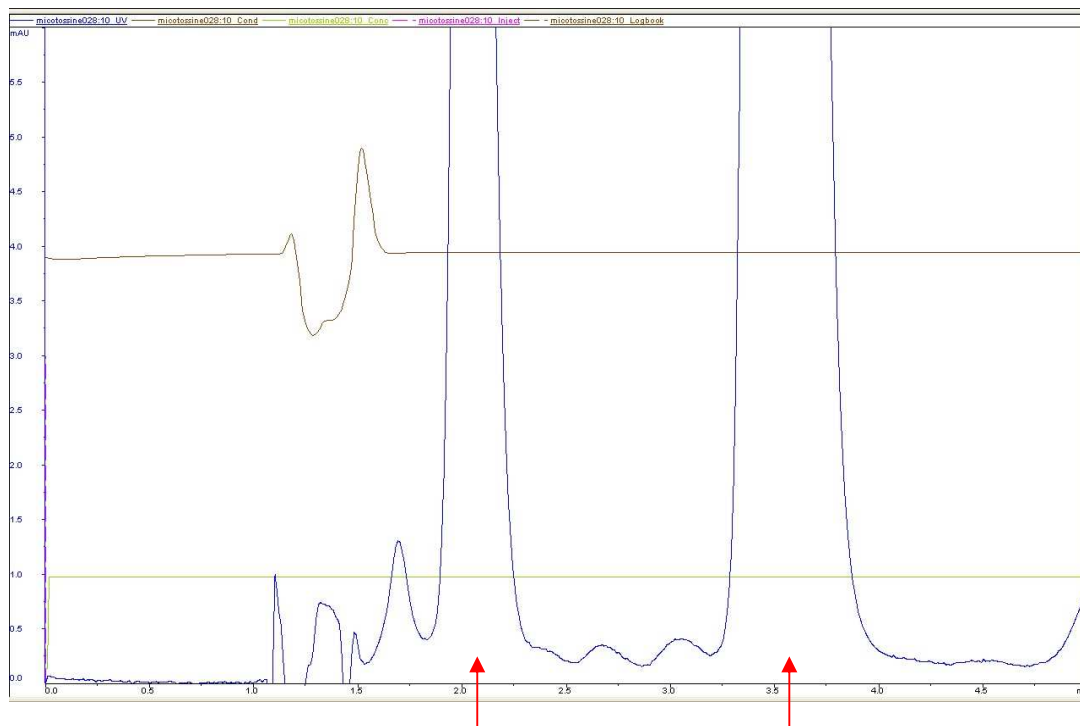


Figura 12: Profilo HPLC monitorato con UV a 280nm del campione contenente il terreno MS acidificato con l'aggiunta di acido citrico e Na_2HPO_4 e contenente acido ferulico. E' stato utilizzato un gradiente binario con isocratica al 15% della colonna B contenente TFA 0,1% in acetonitrile: H_2O 95:5. Il primo picco è stato rilevato a 2,04ml con un'altezza di 27,20mAU ed il secondo picco è stato rilevato a 3,53ml con un'altezza di 72,25mAU.

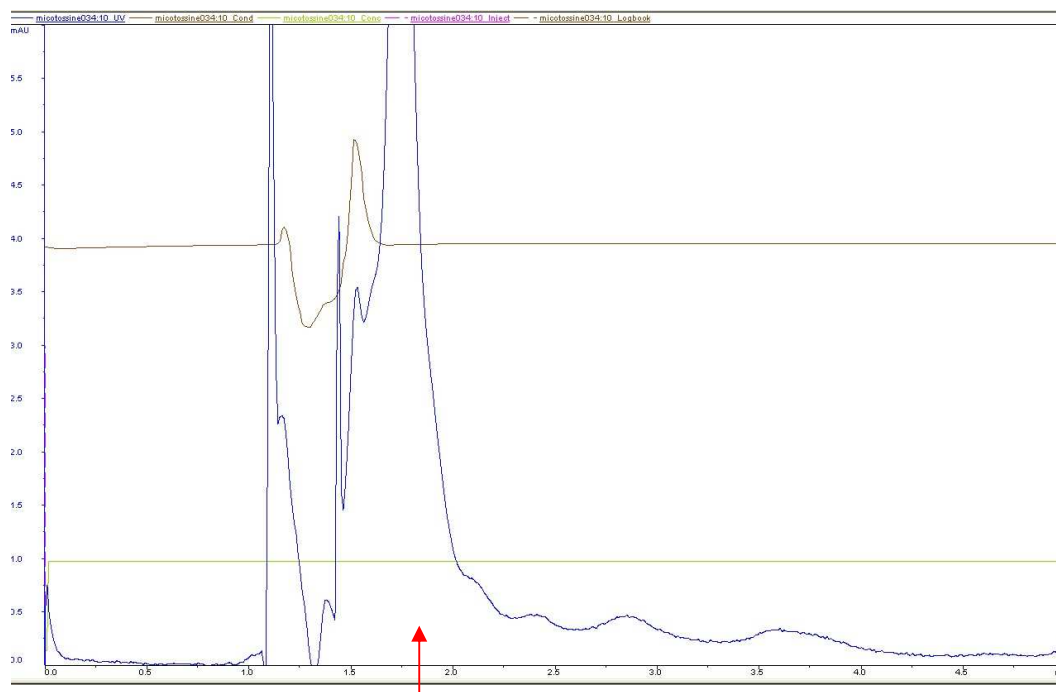


Figura 13: Profilo HPLC monitorato con UV a 280nm del campione contenente il terreno MS con acido ferulico non inoculato con micelio di *F. graminearum*. E' stato utilizzato un gradiente binario con isocratica al 15% della colonna B contenente TFA 0,1% in acetonitrile: H_2O 95:5. E' stato rilevato un unico picco a 1,75ml di altezza 9,99 mAU.

4.3 Presenza di attività laccasica in colture liquide di *Fusarium graminearum*.

E' stato effettuato un saggio colorimetrico dell'attività laccasica come descritto da Wolfenden e Willson (1982). Il monitoraggio è stato effettuato dopo 2, 5 e 8 giorni dall'inoculo del micelio di *F. graminearum*. Tuttavia dalle prove non è emerso alcun segno della presenza di attività laccasica da parte del fungo, nemmeno nei campioni contenenti acido ferulico. Per ottenere un'ulteriore conferma di quest'ipotesi, il saggio colorimetrico è stato effettuato anche su 10 beute contenenti ciascuna 50 ml di due diversi tipi di terreno di coltura (Slomczynski e Szècsi) specifici per l'induzione dell'attività laccasica, e preparati secondo quanto precedentemente descritto in materiali e metodi (vedi paragrafo 3.5). Le misurazioni sono state effettuate dopo 3, 7 e 11 giorni e anche in questo caso non sono stati registrati valori rilevanti che facessero ipotizzare la presenza di un'attività laccasica. In ogni caso, dalle corse dei campioni contenenti il terreno di coltura MS tamponato e non tamponato con acido citrico e Na_2HPO_4 e addizionato con acido ferulico, effettuate per mezzo dell'HPLC, è emersa la presenza di un numero maggiore di picchi non presenti nei campioni contenenti il solo terreno MS tamponato e non tamponato.

5 DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Fusarium graminearum è un fungo fitopatogeno responsabile della fusariosi della spiga (FHB), una delle principali malattie del frumento (Blandino et al., 2010). Durante l'infezione, oltre a produrre enzimi degradativi della parete cellulare dell'ospite (Hammer et al., 1997), questo patogeno avvia anche la sintesi di tricoteceni di tipo B tra cui il più importante è il Deossinivalenolo (DON). Stabilire il livello di questa micotossina nei prodotti vegetali è molto importante perchè il DON e alcuni suoi derivati sono dannosi sia per la salute animale che per quella umana.

Nella prima parte di questo lavoro è stata effettuata un'indagine sui contenuti di DON in campioni di frumento raccolti nel corso delle campagne 2009 e 2010. Dalle analisi effettuate è emerso come le condizioni ambientali influenzino notevolmente l'accumulo della tossina. Infatti i dati registrati nell'anno 2010, relativi al quantitativo di micotossina, si sono dimostrati più elevati rispetto all'anno 2009. Nel 2010 sono state registrate inoltre abbondanti piogge che hanno interessato le colture dalla fase di levata fino alla spigatura e in alcuni casi fino ad inizio fioritura. Tali condizioni climatiche hanno verosimilmente favorito un'elevata produzione di inoculo per l'FHB e le conseguenze si sono potute notare anche sul peggioramento di alcuni parametri qualitativi quali il peso ettolitrico e la percentuale di proteine. L'aumento della presenza di DON è stato inoltre rilevato anche nelle colture su cui era stato effettuato un trattamento con prodotti fitosanitari al momento della spigatura. Nonostante l'incremento della presenza della micotossina, il quantitativo di Deossinivalenolo presente nei campioni analizzati si è mantenuto comunque al di sotto dei limiti imposti dalla Comunità Europea. Infatti per i cereali non trasformati ad uso umano diversi dal grano duro, la legge sancisce un limite di 1250 *ppb* di micotossina, secondo il Regolamento CE 1881/2006; mentre nel caso di granella per uso animale, contenuta in mangimi complementari e completi, il limite è imposto a 8000 *ppb*, secondo la raccomandazione 2006/576 del 17 agosto 2006 contenuta nella Gazzetta Ufficiale della Comunità Europea del 23 agosto 2006.

Come descritto da Jansen et al. (2005), la produzione di Deossinivalenolo è correlata alla manifestazione dei sintomi di FHB. Infatti la sintesi dei tricoteceni durante la fase di infezione è fondamentale per la penetrazione del fungo nel rachide e per il successivo manifestarsi della malattia. Tuttavia, non sono ancora noti tutti i fattori coinvolti nell'attivazione del cluster genico responsabile della biosintesi di questo metabolita. Merhej et al. (2009) hanno però dimostrato come il pH sia un importante induttore

dell'espressione dei geni *TRI* e di conseguenza un fattore inducente della produzione della micotossina. In questo lavoro è stata quindi studiata la capacità del pH di indurre la produzione della micotossina in colture *in vitro* di *Fusarium graminearum*. Inoltre, poiché nei tessuti del frumento c'è un elevato contenuto di acido ferulico (Boutigny et al., 2009), è stato verificato se questa sostanza fenolica sia in grado di modulare la biosintesi del DON. Durante la fase di infezione, infatti, *F. graminearum* deve essere in grado di oltrepassare le strutture difensive dell'ospite che riescono a svolgere la loro azione di barriera contro l'attacco del patogeno in quanto ricche di composti fenolici (Jetter et al., 2006). È stato dimostrato che tale fenolo può inibire la sintesi di micotossine in *F. graminearum* e quindi potrebbe diminuire la virulenza del patogeno (Boutigny et al., 2009).

Per verificare queste due diverse ipotesi, sono state preparate colture liquide di *F. graminearum* secondo quanto descritto in materiali e metodi (vedi paragrafo 3.3). Dalle analisi iniziali effettuate mediante HPLC è emerso come nelle colture contenenti il terreno acidificato vi fosse la presenza di due picchi con altezze più elevate rispetto a quelli riscontrati nelle colture non acidificate. Questi picchi coincidono con quelli del DON e del 15-ADON confermando l'ipotesi che il pH è in grado di stimolare la produzione della tossina. Nelle colture con acido ferulico non è stato possibile stabilire il contenuto di DON in quanto i picchi di acido ferulico e di altri metaboliti si sovrapponevano a quelli delle micotossine. Pertanto, una valutazione del contenuto di DON è stata effettuata con il kit immunoenzimatico *R.O.S.A. CHARM quantitative test*. Quest'analisi, seppur eseguita su un numero limitato di campioni, ha evidenziato che il pH acido e l'acido ferulico svolgono un'azione opposta per quanto riguarda la sintesi di DON, ossia un effetto inducente per quanto riguarda il pH acido e repressivo per l'acido ferulico. L'analisi mediante HPLC tuttavia ha evidenziato che in presenza di acido ferulico il fungo è capace di produrre sostanze la cui natura non è stata indagata nella presente tesi. È noto che molti funghi fitopatogeni sono in grado di contrastare l'effetto dei metaboliti secondari prodotti dall'ospite durante l'infezione. Per esempio *Botrytis cinerea*, fungo necrotrofo patogeno della vite, grazie alla sua attività laccasica è in grado di detossificare lo stilbene resveratrolo (Hoos e Blaich, 1990) presente nei tessuti dell'ospite. Per questo motivo è stata effettuata un'analisi sulla presenza di attività laccasica in *F. graminearum* attraverso il saggio colorimetrico descritto da Wolfenden e Willson (1982). Dai risultati ottenuti è però emerso come *F. graminearum* non possieda attività laccasica e quindi la sua capacità di trasformare l'acido ferulico presente nel

terreno di coltura sia da associare ad altri meccanismi non ancora noti. Un'indagine in silico effettuata sul database di *F. graminearum* ha consentito di identificare nove putativi geni di laccasi. Alla luce dei risultati ottenuti è presumibile che queste laccasi non siano espresse o non siano attive nelle condizioni sperimentali adottate in questa tesi. Successivi studi potranno chiarire se questi geni sono espressi *in vitro*.

In conclusione sembra che il tricotecene Deossinivalenolo, importante fattore di virulenza per la fusariosi della spiga, si accumuli in modo rilevante nelle cariossidi di frumento e ciò è influenzato dalle condizioni ambientali e dall'utilizzo di prodotti fitosanitari al momento della fioritura e spigatura. La presenza di metaboliti secondari della pianta quali l'acido ferulico possono contrastare l'accumulo della tossina. In futuro sarà interessante studiare le modalità di detossificazione utilizzate da *F. graminearum* per contrastare questo fenolo. La conoscenza di questi meccanismi sarà inoltre uno strumento molto importante per ottenere, attraverso la manipolazione genetica, piante più resistenti alla malattia.

6 BIBLIOGRAFIA

- Bai, G.H.; Chen, L.F.; Shaner, G.E. Breeding for resistance to *Fusarium* head blight of wheat in China. In *Fusarium Head Blight of Wheat and Barley*; Leonard, K.J., Bushnell, W.R., Eds.; The American Phytopathological Society: St. Paul, Minnesota, USA, 2003; Chapter 11, pp. 296-317.
- Bhat, R.V.; Beedu, S.R.; Ramakrishna, Y.; Munshi, K.L. Outbreak of Trichothecene mycotoxicosis associated with consumption of mold-damaged wheat products in Kashmir Valley India. *Lancet* 1989, 1, 35-37.
- Bauer J., Garies M., Detzler W., 1987. "Zum Metabolismus von Trichothecene beim Schwein". *Tierarzt. Umsch.*,42:56.
- Billy A.C., Reid L.M., Savard M.E., Reddy R., Blackwell B.A., Campbell C.M., Krantis A., Durst T., Philogène B.J.R., Arnason J.T. & C. Regnault-Roger, 2003. Analysis of *Fusarium graminearum* mycotoxins in different biological matrices by LC/MS. *Mycopathologia* 157: 117-126, 2004.
- Berzaghi P., Pino S., 2011. Modalità di prevenzione della contaminazione da micotossine in campo. Convegno, 2011.
- Blandino M., Mancini M.C., Reyneri A., 2010. Allerta *Fusarium* su grano: riconoscere i sintomi in campo. *L'Informatore Agrario*, 2010.
- Boutigny A.L., Barreau C., Atanasova-Penichon V., Verdal-Bonnin M.N., Pinson-Gadais L., Richard-Forget F., 2009. Ferulic acid, an efficient inhibitor of type B trichothecene biosynthesis and Tri gene expression in *Fusarium* liquid cultures. *Mycological Research* 113: 746- 753, 2009.
- Brown, D.W.; Dyer, R.B.; McCormick, S.P.; Kendra, D.F.; Plattner, R.D. Functional demarcation of the *Fusarium* core trichothecene gene cluster. *Fungal Genet. Biol.* 2004, 41, 454-462.

- Burgess, L.W.; Klein, T.A.; Bryden, W.L.; Tobin, N.F. Head Blight of Wheat Caused by *Fusarium graminearum* Group 1 in New South Wales Australia in 1983. *Australas. Plant Pathol.* 1987, 16, 72-78.
- Casale W.L., Pestka J.J., Hart L.P., 1988. Enzyme-linked immunosorbent assay employing monoclonal antibody specific for deoxynivalenol (vomitoxin) and several analogs. *J. Agric. Food Chem.* 36: 663–668, 1988.
- Chu F.S., 1986. *Immunoassays for mycotoxins.* Academic Press, Orlando, Fla. (USA), 1986.
- De Wolf E. D., Madden L.V., Lipps P.E., 2002. "Risk Assessment Models for Wheat *Fusarium* Head Blight Epidemics Based on Within-Season Weather Data" *Phytopathology* 93:428-435.
- Desjardins A.E., Hohn T.M., McCormick S.P., 1993. Trichothecene Biosynthesis in *Fusarium* Species: Chemistry, Genetics, and Significance. *Microbiological Reviews* 59:595-604, 1993.
- Desmond O.J., Manners J.M., Stephens A.E., Maclean D.J., Schenk P.M., Gardiner D.M., Munn A.L., Kazan K., 2008. The *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol elicits hydrogen peroxide production, programmed cell death and defence responses in wheat. *Molecular Plant Pathology* 9: 435- 445, 2008.
- Gardiner D.M., Kazan K., Manners J.M., 2009. Nutrient profiling reveals potent inducers of trichothecene biosynthesis in *Fusarium graminearum*. *Fungal Genetics and Biology* 46: 604- 613, 2009.
- Gourdain E., Piraux F., Barrier-Guillot B., 2008. A model combining agronomic and weather factors to predict occurrence of deoxynivalenol in durum wheat kernels. *World Mycotoxin Journal* 129-139.
- Grove J.F., 1988. "Non-Macrocyclic Trichothecenes". *Natura Product Report* 5: 187-209, 1988.

- Hammer J. E. and Holden D. W., 1997. Linking approaches in the study of fungal pathogenesis: a commentary. *Fungal Genetics and Biology* 21 – pp. 11 -16.

- Harris L.J., Alexander N.J., Saparno A., Blackwell B., McCormick S.P., Desjardins A.E., Robert L.S., Tinker N., Hattori J., Piché C., Scherthaner J.P., Watson R., Ouellet T., 2007. A novel gene cluster in *Fusarium graminearum* contains a gene that contributes to butenolide synthesis. *Fungal Genetics and Biology* 44: 293- 306, 2007.

- Hill N. S., Schwarz P., Dahleen L. S., Neate S. M., Horsley R., Glenn A. E., O'Donnell K., 2006. ELISA Analysis for *Fusarium* in Barley: Development of Methodology and Field Assessment. Crop Science Society of America, 2006.

- Hohn, T.M.; Desjardins, A.E.; McCormick, S.P. The Tri4 gene of *Fusarium sporotrichioides* encodes a cytochrome P450 monooxygenase involved in trichothecene biosynthesis. *Mol. Gen. Genet.* 1995, 248, 95-102.

- Hoos G., Blaich R., 1990. Influence of resveratrol on germination of conidia and mycelia growth of *Botrytis cinerea* and *Phomopsis viticola*. *Journal of Phytopathology* 129: 102-110.

- Jansen, C.; von, W.D.; Schaefer, W.; Kogel, K.H.; Felk, A.; Maier, F.J. Infection patterns in barley and wheat spikes inoculated with wild-type and trichodiene synthase gene disrupted *Fusarium graminearum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2005, 102, 16892-16897.

- Khonga E.B., Sutton J.C., 1988. "Inoculum production and survival of *Giberella zeae* in maize and wheat residues". *Plant Pathology* 10: 232-239.

- Kriel, W.M.; Pretorius, Z.A. The FHB challenge to irrigation wheat production in South Africa. *Cereal Res. Commun.* 2008, 36, 569-571

- Ilgen P., Hadel B., Maier F.J., Schäfer W., 2009. Developing kernel and rachis node induce the trichothecene pathway of *Fusarium graminearum* during wheat head infection. *The American Phytopathological Society*, Vol. 22, N°8, 899-908, 2009.

- Lysøe E., Seong K.Y., Kistler H.C., 2011. The transcriptome of *Fusarium graminearum* during the infection of wheat. *Molecular Plant-Microbe Interactions* "First Look" paper, 2011.

- Maier, F.J.; Miedaner, T.; Hadel, B.; Felk, A.; Salomon, S.; Lemmens, M.; Kassner, H.; Schaefer, W. Involvement of trichothecenes in fusarioses of wheat, barley and maize evaluated by gene disruption of the trichodiene synthase (Tri5) gene in three field isolates of different chemotype and virulence. *Mol. Plant Pathol.* 2006, 7, 449-461.
- Merhej J., Boutigny A.L., Pinson-Gadais L., Richard-Forget F., Barreau C., 2009. Acidic pH as a determinant of *TRI* gene expression and trichothecene B biosynthesis in *Fusarium graminearum*. *Food Additives and Contaminants* Vol.25, N°5, 710-717, 2010.
- Pancaldi, D., Campagna C., Haidukowski M., Pascale M., Perrone G., Visconti, A., 2005. Effect of fungicide treatments on *Fusarium* head blight and deoxynivalenol content in wheat kernels [*Triticum aestivum* L.; *Triticum durum* Desf.; Emilia-Romagna]. *Informatore Fitopatologico* 55: 57-61, 2005.
- Parry, D.W.; Jenkinson, P.; McLeod, L. *Fusarium* ear blight (scab) in small grain cereals- a review. *Plant Pathol.* 1995, 44, 207-238.
- Ponts N., Couedelo L., Pinson-Gadais L., Verdal-Bonnin M.N., Barreau C. & Richard-Forget F., 2009. *Fusarium* response to oxidative stress by H₂O₂ is trichothecene chemotype-dependent. *Research Letter* 2009.
- Prandini A., Sigolo S., Filippi L., Battilani P., Piva G., 2009. Review of predictive models for *Fusarium* head blight and related mycotoxin contamination in wheat. *Food Chem Toxicol* 5: 927-931, 2009.
- Proctor, R.H.; Hohn, T.M.; McCormick, S.P. Reduced virulence of *Gibberella zeae* caused by disruption of a trichothecene toxin biosynthetic gene. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 1995, 8, 593-601.
- Reyneri A., Scudellari D., Blandino M., D'Egitto M.G., Plizzari L., 2010. Grano tenero “sano” con la giusta precessione culturale. Speciale grano Tenero, *L'Informatore Agrario*, 2010.
- Raccomandazione 2006/576 del 17 agosto 2006 contenuta nella Gazzetta Ufficiale della Comunità Europea del 23 agosto 2006.
- Regolamento CE 1881/2006. Tenori massimi di micotossine per prodotti alimentari.

- Rotter BA, Prelusky DB, Pestka JJ, 1996. "Toxicology of deoxynivalenol (vomitoxin)." *Journal of Toxicology and Environmental Health* 48: 1-34.
- Sano A., Matsutan S., Suzuki M., Takitani S., 1987. High-performance liquid chromatographic method for determining trichothecene mycotoxins by post-column fluorescence derivatization. *Journal of Chromatography A* 410: 427-436, 1987.
- Scott, D.B.; De Jager, E.J.H.; Van Wyk, P.S. Head blight of irrigated wheat in South Africa. *Phytophylactica* 1988, 20, 317-319.
- Slomczynski D., Nakas J.P., Tanenbaum S.W., 1995. Production and characterization of laccase from *Botrytis cinerea* 61-34. *Applied and Environmental microbiology* 61: 907- 912.
- Stack, R.W. History of *Fusarium* head blight with emphasis on North America. In *Fusarium Head Blight of Wheat and Barley*; Leonard, K.J., Bushnell, W.R., Eds.; The American Phytopathological Society: St. Paul, Minnesota, USA, 2003; Chapter 1, pp. 1-3.
- Szécsi A., 1990. Analysis of pectic enzyme zymograms of *Fusarium* Species. II. Comparison of polygalacturonase zymograms of *Fusarium culmorum* and *Fusarium graminearum*. *Journal Phytopathology* 130: 188-196.
- Tag, A.G.; Garifullina, G.F.; Peplow, A.W.; Ake, C., Jr.; Phillips, T.D.; Hohn, T.M.; Beremand, M.N. A novel regulatory gene, *Tri10*, controls trichothecene toxin production and gene expression. *Appl. Environ. Microbiol.* 2001, 67, 5294-5302.
- Ueno Y., 1977. "Mode of action of trichothecenes." *Ann Nutr Aliment* 31: 885-900, 1977.
- Van der Fels-Klerx H.J., Burgers S., Booij C., 2010. "Descriptive modeling to predict deoxynivalenol in winter wheat in The Netherlands". *Food Additives and Contaminants* 27: 636-643.
- Wanyoike W.M., Zhensheng K. and Buchenauer H., 2002. Importance of cell wall degrading enzymes produced by *Fusarium graminearum* during infection of wheat heads. *European Journal of Plant Pathology* 108: 803-810.
- Wolfenden B.S., Willson R.L., 1982. Radical-cations as reference chromogenes in kinetic studies of one-electron transfer reactions: pulse radiolysis studies of 2-2'azinobis-(3-

ethylbenzthiazoline-6-sulphonate). Journal of Chemical Society – Perkin transactions II 805-812.

- Xu, X.M.; Nicholson, P.; Thomsett, M.A.; Simpson, D.; Cooke, B.M.; Doohan, F.M.; Brennan, J.; Monaghan, S.; Moretti, A.; Mule, G.; Homok, L.; Beki, E.; Tatnell, J.; Ritieni, A.; Edwards, S.G. Relationship between the fungal complex causing *fusarium* head blight of wheat and environmental conditions. Phytopathology 2008, 98, 69-78.

*Un ringraziamento particolare a
Silvio Pino e a tutto il personale
dell'Istituto "N. Strampelli" di Lonigo (VI):
Anna, Flavia, Franco, Pierluigi, Renzo, Rosalia e Simonetta.*

